



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Kodlama Yapmayan Uzun RNA HOTTIP' in  
Periampuller Bölge Tümörlerindeki Klinik Öneminin  
Araştırılması**

**Dr. Özkan BALÇIN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa – 2016**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**Kodlama Yapmayan Uzun RNA HOTTIP' in  
Periampuller Bölge Tümörlerindeki Klinik Öneminin  
Araştırılması**

**Dr. Özkan BALÇIN**

**Danışman: Prof. Dr. Ekrem KAYA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa – 2016**

## İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet .....	II
İngilize Özet .....	IV
Giriş .....	1
Gereç ve yöntem .....	10
Bulgular .....	14
Tartışma .....	20
Kaynaklar .....	25
Teşekkür.....	29
Özgeçmiş.....	30

## ÖZET

Periampuller bölge tümörlerinde erken tanı ve prognozun tayini henüz çözülememiş bir problemdir. Bu çalışmada, son yıllarda keşfedilen ve kanser oluşumunda rol oynadığı bilinen bir kodlama yapmayan uzun RNA olan distal tipteki HOXA transkripti (HOXA transcript at the distal tip-HOTTIP) 'nin periampuller bölge tümörlerindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 2006 - 2014 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (U.Ü.T.F) Genel Cerrahi Anabilim Dalı 'nda periampuller bölge tümörleri nedeniyle cerrahi uygulanan 100 hasta değerlendirildi. Spesmenlerdeki tümörlü ve tümörsüz dokularda Real-Time PCR yöntemi kullanılarak HOTTIP ekspresyon tayini ve DNA sekanslama yöntemi ile *KRAS* mutasyon durumu araştırıldı. Elde edilen bulgular ile patolojik parametreler karşılaştırıldı ve hastalısız sağ kalım / genel sağ kalım ile ilişkileri web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz istatistik programı kullanılarak analiz edildi.

Olguların ortalama yaşı 62 (26 – 91) olup 78 'i erkek, 22 'si kadındır. Olguların 46 'sı pankreas başı, 34 'ü ampulla vateri, 12 'si distal koledok ve 8 'i de duodenum tümörü idi. HOTTIP ekspresyonu, normal doku ile karşılaştırıldığında; tümöral dokuda 32 kat fazla idi ( $p=0,013$ ). 100 olgunun 29 'unda *KRAS* kodon 13 mutasyonu saptandı. *KRAS* kodon 13 mutasyonu taşımayan 71 olgunun % 86 'sında HOTTIP 'in yüksek ekspresyon gösterdiği belirlendi ( $p=0,03$ ). HOTTIP ekspresyonu pankreas başı ve ampullada lokalize tümörlerde 8,3 ve 5,2 kat, infiltratif karakterlilerde 5 kat, lenfatik invazyonu olanlarda 8 kat ve rezeksiyon sonrası ilk 6 ayda ölenlerde 8,7 kat daha fazla idi (sırası ile  $p=0,0001$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,003$ ,  $p=0,001$  ve  $p=0,001$ )

Bu çalışmanın sonucuna göre; periampuller bölge tümörlerinde, HOTTIP tayini prognoz takibinde etkili olabilecek bir biyobelirteç adaydır. Ayrıca, *KRAS* mutasyonu bulunmayan periampuller bölge tümörlerinde, HOTTIP ekspresyonununun anlamlı derecede fazla olması bu tümörlerin

oluşumunda sadece genetik değil epigenetik mekanizmaların da aktif olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Periampuller Bölge Tümörleri, RNA, KRAS, HOTTIP, Prognoz



## SUMMARY

The medical and surgical treatment of periampullary tumors is difficult to estimate the impact of prognosis. Recent studies indicate that long non-coding RNAs (lncRNAs) play crucial roles in tumorigenesis. The objective of this study is to investigate the effect and role of long non coding RNA HOXA transcript at the distal tip (HOTTIP) on prognosis of periampullary region tumors.

A total of 100 periampullary region cancer cases were determined at the Department of General Surgery, Uludag University Hospital from 2006 to 2014. Each patient was histopathologically diagnosed as any periampullary region tumors. HOTTIP expression profile was determined using Real-Time PCR in tumors and non-tumor tissues. KRAS gene were screened by DNA sequencing in 100 patients. Relationships between data, patient clinicopathological parameters and disease-free survival and overall survival were analysed by using Web-based Sabiosciences PCR-Data Analysis programme.

The present study unrelated patients with periampullary region tumors, including 78 males and 22 females, aged 26-91 years; the median age at the time of diagnosis was 62 years. Primary tumors were localized in the head of the pancreas in 46 cases, the papilla of Vater in 34 cases, the duodenum in 8 cases and the distal bile duct in 12 cases. The expression level of HOTTIP was 32-fold upregulated in tumors (n=100) relative to normal tissues (n=92) (p=0,013). Point mutation in *KRAS* gene codon 13 was identified in 29 cases. HOTTIP expression was upregulated in mutation (-) tumors compared (n=71) to mutation (+) tumors (n=29) (p=0,03) The presence of the primary tumor in the pancreas head and papilla of Vater was significantly associated with upregulated expression of HOTTIP compared to other primary tumor locations (p=0,0001; p=0,003). The expression of HOTTIP was 5,09-fold upregulated in patients with infiltrative growth tumors and 8,01-fold upregulated in patients with lymphatic invasion positive tumors

( $p=0,003$ ;  $p=0,001$ ). The expression level of HOTTIP was 8,75-fold upregulated in patients die during the 6 months after surgery.

The elevated expression of HOTTIP may be involved in the progression of periampullary region tumors and may therefore be considered a prognostic factor for patients with poor prognosis. Furthermore, HOTTIP expression was observed high level in tumors without mutation of *KRAS* gene. This result shows that epigenetic mechanisms maybe as important as genetic mechanism in cancer progression.

Key Words: Periampullary Region Tumors, RNA, KRAS, HOTTIP, Prognosis



## GİRİŞ

Kanser, insan yaşamını; fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden olumsuz etkileyen, dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenleri arasında, mücadelesi en zor olan hastalık olup ülkemizde sebebi bilinen ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (1). Genetik ve epigenetik mekanizmaların bozulması sonucu gelişen kanserlerde erken tanı en önemli prognostik faktördür.

DNA molekülündeki nükleotidlerin dizilişi canlının tüm hücrelerinde aynıdır. Buna rağmen hücreler arası farklılıklar gen ifadesindeki değişikliklerden kaynaklanır. Gen ekspresyonu da denilen bu olay DNA dizilerinden oluşan genlerin fonksiyon gören protein yapılarına dönüşmesi sürecidir. DNA baz diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın, çevresel faktörlerden etkilenebilen birtakım mekanizmalar sayesinde, hücrenin fenotipinin belirlendiği, gen ifadesinde meydana gelen ve kalıtımla aktarılabilen değişiklikler epigenetik olarak adlandırılır (2,3). Belli genlerin ne zaman ve nasıl aktive olacağını belirleyen epigenetiğin moleküler temeli karmaşık bir seri olaylardan oluşur.

Epigenetik mekanizmalar üç ana başlık altında toplanmaktadır (4);

1. DNA metilasyonu,
2. Histon modifikasyonları,
3. RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing).

Gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler bu mekanizmaların birlikte çalışması sonucu oluşur. Bu mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına yada baskılanmasına neden olarak epigenetik mekanizmaların bozulması sonucu oluşan kanserlere yol açabilmektedir (4). RNA ile indüklenen sessizleşme; ana DNA molekülünden RNA molekülü elde edildikten sonra



kodlama yapmayan RNA (nonkoding RNA) 'nın, kodlayıcı RNA 'yı (mRNA) etkileyerek protein sentezini engellemesini içerir (5).

Proteine çevirisi yapılmayan, işlevsel RNA molekülleri olan kodlama yapmayan RNA 'lar; proteine çevrilen RNA 'ların yapısal, işlevsel, katalitik rollerinde ve gen ifadesinin düzenlenmesi üzerine etkili olan RNA interferans denilen gen susturulması mekanizmasında rol almaktadırlar (6-8).

Hedeflenen bu çalışmada kodlamayan uzun RNA (LncRNA) HOTTIP 'in ekspresyon profillerinin incelenmesi ile; Türk populasyonuna ait, sporadik kökenli periampuller bölge tümörlü hastalarda kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Projenin başarı ile tamamlanabilmesi ile elde edilecek sonuçlar uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlayabilecektir.

## **I. Periampuller Bölge Tümörleri**

Anatomik olarak periampuller bölge kompleks bir bölgedir. Pankreas başı, ampulla vateri, koledokun pankreatik parçası ve duodenumun periampuller kısmı, hep birlikte periampuller bölgeyi oluştururlar. Tüm gastrointestinal sistem (GİS) kanserlerinin yaklaşık %0,5-2 'sini oluşturan periampuller bölge tümörleri ampulla vateri, pankreas başı, distal kolanjiyosellüler ve duodenum tümörlerinden oluşmaktadır. Bu tümörler arasında en sık olarak pankreas başı ve ampulla vateri kanseri görülmektedir (9-11). Pankreatikoduodenektomi yapılan periampuller bölge tümörlerinin % 50-70 'ini pankreas başı, %15-25 'ini ampulla vateri, %10 'unu biliyer ve %10 'unu duodenal kitleler oluşturur (12).

Günümüzde gelişmiş tanı prosedürlerine rağmen halen ölüm oranlarının bu kadar yüksek olmasının nedeni; yine tanıdaki gecikmeler ve bu bölge tümörlerinin agresif biyolojik davranışa sahip olmalarıdır. Tedavi ve prognozda en büyük pay cerrahiye aittir. Sağ kalımı etkileyen diğer faktörler ise düşük tümör evresi, negatif cerrahi sınırlar, lenf nodu metastazının olmaması, vasküler invazyonun yokluğu ve tümörün iyi diferansiyasyonudur.

Periampuller bölge tümörleri köken aldıkları dokuya göre değişik biyolojik davranış gösterir ve kendi içlerinde de prognozları aynı değildir.

Buna rağmen klinik özellikleri ve cerrahi tedavi prensipleri benzer olduğundan dolayı beraber değerlendirilmektedirler.

### **I.A. Pankreas Başı Kanserleri**

Pankreas başı kanserleri periampuller bölge tümörlerinin %50-70 'ini oluşturmaktadır (12). Tüm dünyadaki kanser sebepli ölümler arasında akciğer, kolorektal ve meme kanserinden sonra 4. sırada yer almaktadır (13). Tüm dünyada, her yıl, 265000 'in üzerinde pankreas kanserine yakalanan hastaların %74 'ü tedavi sonrası ilk bir yıl içinde ölmektedir (14). Pankreas kanseri tüm maligniteler içinde 5 yıllık sağ kalımı % 6 'lık oranla en kötü prognoza sahip kanserdir (15). Türkiye 'de GİS kanserlerinin %10 'unu oluşturmakta ve GİS kanserlerinde mide ve kolon kanserinden sonra yer almaktadır (16).

Pankreas kanserlerinin tedavisinde en büyük pay cerrahi rezeksiyonudur. Ancak cerrahi rezeksiyon şansına hastaların ancak %20-30 'u sahip olabilmektedir. Son dönemde pankreatikoduonektomi (Whipple prosedürü) uygulanan hastalardaki 5 yıllık sağ kalım artmış ve % 20 'ye yaklaşmıştır. Erken tanı alan 2 cm den küçük pankreasa sınırlı tümörlerde, 5 yıllık sağ kalım oranı % 46 'ya ulaşabilmektedir (17). Neoadjuvan tedavilerin başarısı henüz gösterilememiştir. Adjuvan tedaviler ve inoperable metastatik hastaların tedavileri sonucu elde edilen başarı ise sınırlıdır.

## I.A.a. Pankreas Kanserlerinin Moleküler ve Biyolojik Özellikleri

Pankreas kanseri etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte yaş, cinsiyet ve sigara içimi, diyabet, beslenme ve aile kanser hikayesi başta gelen risk faktörleridir (16) (Tablo-1).

Tablo-1: Pankreas Kanserleri Risk Faktörleri.

Kalıtsal Sendromlar	Kalıtsal Olmayan Risk Faktörleri
Kalıtsal Meme/Over Kanserleri (BRCA1, BRCA2, PALB2)	Kronik Pankreatit
Ailesel Atipik Multiple Mol Melanoma (FAMMM) Sendromu (CDKN2A)	Diyabetes Mellitus, Glukoz Metabolizması, İnsülin Direnci
Peutz-Jeghers Sendromu (STK11)	Sigara İçimi
Ailesel Adenomatöz Polipler (FAP)	Obezite, Fiziksel İnaktivite
Ailesel Non-Polipozis Kolon Kanseri (HNPCC) (MMR)	Diyet
Ailesel Pankreatik Kanserler (Tanımlanmış Gen Yok)	Kahve ve Alkol Tüketimi
Ataksi Telenjektazi (ATM)	Aspirin ve Steroid Olmayan Anti-inflamatuar İlaç Kullanımı
Li-Fraumeni Sendromu (p53)	Helikobakter Pylori Enfeksiyonu

Modern moleküler ve biyolojik teknikler kullanılarak yapılan son buluşlar pankreas kanserinin nedenlerine yönelik ışık tutmaktadır. Genetik ve çevresel faktörlerin birlikteliği pankreas kanserinin etyolojisini oluşturur (18). Riskli toplumların taraması için, DNA sekanslaması gibi daha iyi tanı koydurucu araçların bulunması ve klinik kullanımı ile bu faktörler giderek daha da anlaşılacaktır.

## I.B. Ampulla Vateri Tümörleri

Tüm GİS kanserlerinin % 0,2 'sini, periampuller bölge tümörlerinin ise % 7-15 'ini oluştururlar (19). Ampuller kanserler genellikle sporadik olmakla birlikte, bazı kalıtsal sendromlar bu kanser türü için daha yüksek bir risk ile ilişkilidir. Bunlara örnek; Ailesel (familyal) adenomatöz polipozis (FAP) tanılı hastalarda sıklıkla duodenumda gelişen adenomlar bunların genel popülasyona göre periampuller bölge kanseri gelişme riskini %100 - %200 arasında artırır (20). Bu tümörler, diğer periampuller bölge tümörlerine

kıyasla daha iyi bir prognoza sahiptir. Ampulla vateri tümörlerinin avantajı tıkanma sarılığının erken oluşması olarak açıklanmaktadır (21). Rezeksiyon yapılan olgularda 5 yıllık sağ kalım oranı % 34 - 45 arasında değişmektedir (18).

### **I.C. Duodenum Tümörleri**

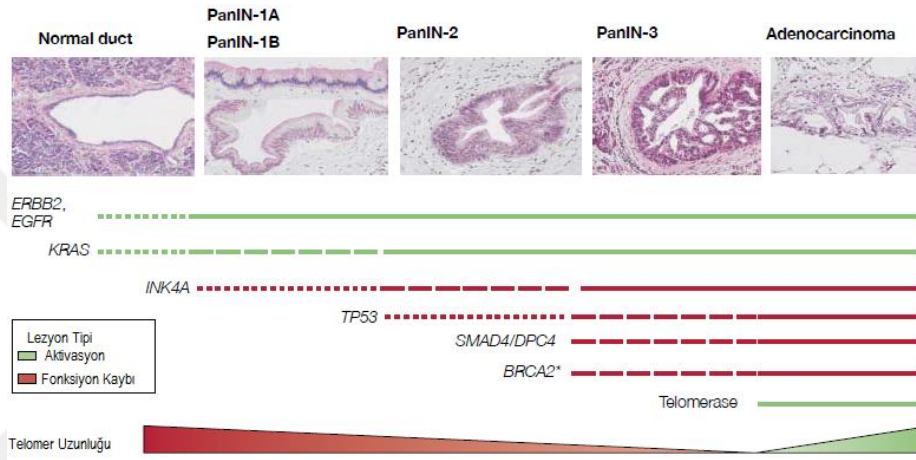
Bu bölgede oluşan tümörler en az sıklıkla görülen periampuller bölge tümörleridir. GİS kanserlerinin % 0,4 'ünü, ince barsak kökenli tümörlerin %45 'ini oluşturmaktadır. Duodenal tümörler FAP ile ilişkili olarak duodenal poliplerden köken alırlar. En sık adenokarsinom saptanır. Rezeksiyon yapılabilen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık % 50 'lerdedir (22).

### **I.D. Distal Koledok Tümörleri**

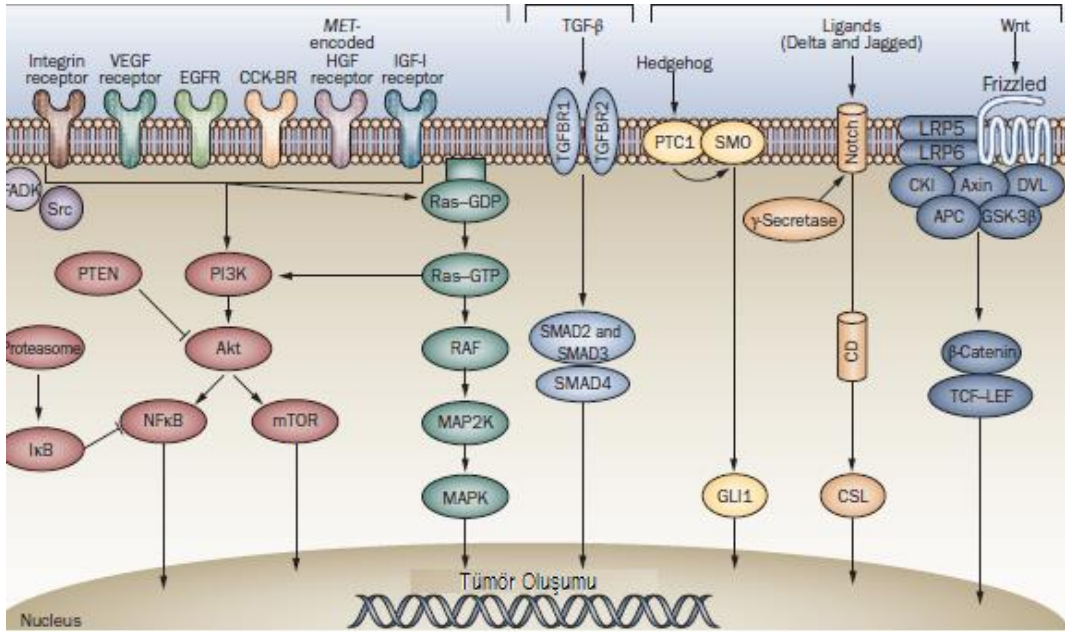
Distal koledok tümörleri, GİS kanserlerinin yaklaşık olarak %3 'ünü oluşturmaktadırlar. Diğer periampuller bölge tümörlerine oranla prognozu daha kötüdür ve 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık olarak %15 'lerde seyretmektedir (22).

## II. Periampuller Bölge Tümörlerinin Oluşumunda Etkili Olan Genetik ve Epigenetik Mekanizmalar

Periampuller bölge tümörleri, tümör baskılayıcı genlerin kaybı ve/veya protoonkogenlerin onkogene dönüşümleri sonucunda, hücrenin normal işleyişinde etkili olan sinyal yollarında meydana gelen değişimler ile başlamaktadır (23). Yapılan çalışmalar ile bu bölge tümörlerinde etkili olan genetik ve epigenetik değişimlerin bir kısmı tanımlanmıştır (24) (Şekil-1 ve Şekil-2).



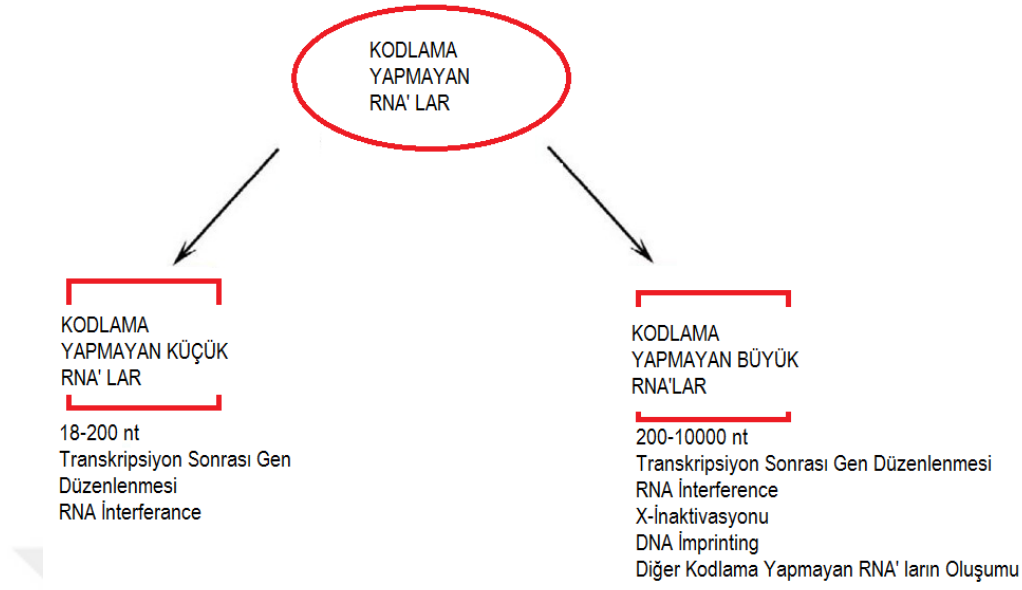
Şekil-1: Pankreas Adenokarsinomlarında Etkili Olan Genler.



Şekil-2: Periampuller Bölge Tümörlerinde Etkili Olan Sinyal Yolları

Pankreas kanserlerinin % 80-100 'ünün gelişiminde Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene (*KRAS*) geninin 12. ve 13. kodonlarında meydana gelen nokta mutasyonlarının etkili olduğu belirlenmiştir (25). Çoğu periampuller bölge tümörlerinde, prekürsör lezyonların invaziv karakter kazanmasında *KRAS* gen mutasyonlarının, ilk olarak meydana gelen genetik olaylardan biri olduğu bilinmektedir (24,26). Normal bir epitel hücresinde bir protoonkogen olan *KRAS* kontrollü hücre proliferasyonunda görev almaktadır. *KRAS* 'da meydana gelen mutasyonlar, bu genin onkogene dönüşümünü sağlamaktadırlar. *KRAS* gen mutasyon oranı düşük evreli periampuller bölge tümörlerinde %50 oranındayken evre arttıkça mutasyon görülme sıklığı da artmaktadır (24). Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada *KRAS* mutasyonlarının tümör evresi ve karaciğer metastazı gibi klinik parametrelerle önemli derecede ilişkili olduğu da belirtilmiştir (27). Periampuller bölge tümörlerinde, prekürsör lezyonların ve bu oluşumlardaki genetik değişimlerin belirlenmesi, invaziv kanser gelişiminden önce erken tanı ve olası terapötik müdahale imkanı sağlayacaktır.

Yüksek organizmalı canlılarda genetik materyal DNA olup, DNA'daki bilgi RNA'ya aktarılmaktadır. RNA 'nın işlevi de bu aktarılan bilgiyi proteine çevirmektir (28). 2000 'li yılların başlarından itibaren, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine dönüşümü gerçekleşmeyen RNA molekülleri keşfedilmiştir ve bunlar kodlamayan RNA 'lar olarak tanımlanmışlardır (29). Günümüzde sadece memelilerde tanımlanabilen kodlamayan RNA 'ların sayısı 20,000 'i geçmiştir (30,31). Değişik nükleotid sayısı içeren bu RNA molekülleri sahip oldukları büyüklüklere göre; küçük protein kodlamayan RNA 'lar (20-25 nükleotid) ve büyük protein kodlamayan RNA 'lar (200 ve üstü nükleotid) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (32) (Şekil-3).



Şekil-3: Kodlama Yapmayan RNA 'ların Sınıflandırılması.

Kodlamayan RNA 'lar ile ilgili yapılan çalışmalarda daha çok, küçük RNA molekülleri olarak tanımlanan miRNA 'lar üzerinde yoğunlaşmıştır (33,34). Bu çalışmalar gösteriyor ki; RNA interferans olarak adlandırılan gen susturma mekanizması miRNA 'lar ile sınırlı kalmamaktadır (35). Transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinin yanı sıra kromatin yapısında ve pre-mRNA 'nın olgunlaştırılmasında görev alan LncRNA 'ların da miRNA 'lar gibi hücrede epigenetik mekanizmalarda görev aldıkları gösterilmiştir (36). Nükleotit sayısı 200 ve üstü olan, kodlama yapmayan bu uzun RNA 'lar, RNA polimeraz 2 tarafından sentez edilmeleri ve Poly A yapısı taşımalarından dolayı mRNA 'lara benzemektedirler (37-39).

Kanser ve LncRNA 'lar ile yapılan çalışmalar sonucunda, ANRIL, XİST, H19, MALAT1 ve PTENP1 başta olmak üzere onlarca LncRNA tanımlanmış ve bunların birçoğunun kanser spesifik biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir (40-44). Ancak, farklı populasyonlara ait hastalarda kanser spesifik çalışmalar oldukça yetersiz kalmaktadır. Özellikle GİS kanserleri içerisinde yer alan ve heterojen bir grup olan periampuller bölge tümörlerinde az sayıda LncRNA ekspresyon çalışması bulunmaktadır. 2015 yılında Wang ve arkadaşları, microassay yöntemi kullanarak pankreas kanseri tanısı almış 144 hastada, 7419 LncRNA 'nın ekspresyonunu incelemişlerdir. Çalışma

sonucunda tüm LncRNA 'ların arasında sadece HOTTIP 'i, pankreas kanseri ile ilişkili bulmuşlardır (45). Ayrıca Cheng Y. ve arkadaşları yine pankreas kanserlerinde HOTTIP 'in ekspresyonunun, hücre proliferasyonu ve migrasyon ile anlamlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (46). Farklı etnik kökene ve farklı prognostik karakterlere sahip hastalara ait materyallerden elde edilecek bilgiler bu konudaki bilgi birikimlerine büyük katkı sağlayacaktır. Türk popülasyonunda yapılmış bir çalışma ise henüz literatürde yer almamaktadır.





## GEREÇ ve YÖNTEMLER

### Hasta Grubu

Çalışmaya 2006 – 2014 yılları arasında U.Ü.T.F. Genel Cerrahi kliniğinde periampuller bölge tümörü tanısı ile pankreatikoduodenektomi uygulanan, BUAP(T)-2012/1 proje kapsamında KRAS kodon 12, 13 ve 61 mutasyon analizi yapılmış 100 hasta dahil edildi (47). Hastaların demografik ve klinik verilerine hasta dosyaları taranarak ulaşıldı. Çalışmaya dahil edilen tüm vakalar sporadik oluşan periampuller bölge tümörlerinden herhangi birine sahiptir. Seçilen grupta, neoadjuvan tedavi almayan lokal ileri yada uzak metastazı olmayan, rezektable ve perioperatif dönemde ölmeyen hastalar yer almaktadır. Araştırmaya dahil edilen hastaların normal ve tümör doku materyallerinin temini; U.Ü.T.F. Araştırma Etik Kurulu 'nun 2016-2/34 no 'lu kararı ile uygun bulunduktan sonra, bu hastalara ait tümörlü ve normal dokuyu en iyi temsil eden parafin bloklar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edildi. 8 hastaya ait normal dokuda cerrahi sınır pozitif olup yeterli saflıkta cDNA sentezi elde edilemediğinden (normal doku analizi için), bu hastalar; normal doku ve tümöral doku karşılaştırması yapılırken istatistik dışı bırakıldı.

Ameliyat sonrası hastalığın tekrarlaması olarak tanımlanan lokal nüks ve uzak metastaz varlığını gözlemleyebilmek için hastaların, tanı sonrası en az 2 yıllık kayıtları incelendi. Whipple prosedürü sonrası lokal nüks / uzak metastaz oluşumuna kadar geçen süre hastalıksız sağ kalım, rezeksiyondan ölüme kadar geçen süre ise genel sağ kalım olarak ifade edildi. Klinik takip, ameliyat sonrası biyokimyasal analizler, görüntüleme teknikleri ve periyodik poliklinik kontrolleri ile yapıldı.

## Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Rezeksiyon sonrası formalin ile fikse edilip parafin içerisine gömdürülen ve patalog tarafından değerlendirilen 100 tümör ve aynı hastalara ait 100 normal doku patoloji arşivinden temin edildi. Parafin bloklardan 0.2 - 0.4 cm doku kesilerek ependorf tüp içerisine alındı. Materyaller, BIOstic (MO BIO, USA) ile 2 kez muamele edilerek parafinden arındırıldı. BIOstic ile doku üzerindeki parafin çözdürüldükten sonra materyaller, %100 - %70 ve %40 'lık alkol aşamalarından geçirildi ve alkol oda ısısında uçuruldu. Bu aşamalardan sonra 100 hastaya ait tümör ve normal dokulardan, RNA izolasyonuna uygun ticari kit (QIAGEN, USA) ile prosedüre uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA 'ların miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 Spektrometre (THERMO SCIENTIFIC, USA) cihazı kullanılarak, 260-280 nm 'deki dalga boyunda ölçüldü. 260/280 oranında 1.80 ve 2.01 değerleri arası RNA saflığı için standart olarak kabul edildi (Tablo-2).

Tablo-2: Hastalara ait örneklerin RNA konsantrasyonları ile ilgili nanodrop ölçümleri.

Örnek ID	Nükleik Asit Kons.	Ünite	A260	A280	260/280	Örnek Tipi	Örnek ID	Nükleik Asit Kons.	Ünite	A260	A280	260/280	Örnek Tipi
1	123,2	ng/µl	0,349	0,188	1,85	RNA	51	115	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
2	128	ng/µl	2,979	1,581	1,88	RNA	52	146,1	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA
3	110,2	ng/µl	2,268	1,205	1,88	RNA	53	87	ng/µl	0,597	0,343	1,74	RNA
4	59	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	54	264	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA
5	142,6	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA	55	102	ng/µl	1,615	0,905	1,78	RNA
6	90,7	ng/µl	0,856	0,483	1,77	RNA	56	148	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA
7	56,1	ng/µl	0,856	0,483	1,77	RNA	57	41,7	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA
8	154	ng/µl	0,3	0,182	1,65	RNA	58	175	ng/µl	5,622	2,991	1,88	RNA
9	110,2	ng/µl	0,429	0,221	1,94	RNA	59	182	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA
10	58,7	ng/µl	18,08	9,915	1,82	RNA	60	201	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA
11	69	ng/µl	0,987	0,545	1,81	RNA	61	59	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
12	145	ng/µl	10,16	5,401	1,88	RNA	62	110,2	ng/µl	0,429	0,221	1,94	RNA
13	165	ng/µl	1,615	0,905	1,78	RNA	63	58,9	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA
14	129	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA	64	85,7	ng/µl	7,359	3,798	1,94	RNA
15	58,9	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA	65	66	ng/µl	0,415	0,245	1,69	RNA
16	85,7	ng/µl	7,359	3,798	1,94	RNA	66	126	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA
17	148	ng/µl	0,415	0,245	1,69	RNA	67	458	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA
18	125	ng/µl	2,896	1,493	1,94	RNA	68	145	ng/µl	3,414	1,777	1,92	RNA
19	360,1	ng/µl	0,644	0,358	1,8	RNA	69	105	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA
20	85,7	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA	70	89,2	ng/µl	2,22	1,18	1,88	RNA
21	65	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA	71	90	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA
22	225	ng/µl	12,31	6,411	1,92	RNA	72	170	ng/µl	12,31	6,411	1,92	RNA
23	325	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA	73	165	ng/µl	0,667	0,321	2,08	RNA
24	126	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA	74	178	ng/µl	3,077	1,607	1,92	RNA
25	458	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA	75	56,1	ng/µl	0,856	0,483	1,77	RNA
26	145	ng/µl	3,414	1,777	1,92	RNA	76	85,7	ng/µl	7,359	3,798	1,94	RNA
27	105	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA	77	148	ng/µl	0,415	0,245	1,69	RNA
28	75,2	ng/µl	0,639	0,366	1,74	RNA	78	75,2	ng/µl	0,639	0,366	1,74	RNA
29	156	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	79	156	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
30	101,7	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA	80	101,7	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA
31	120	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	81	120	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
32	158	ng/µl	0,293	0,165	1,78	RNA	82	158	ng/µl	0,293	0,165	1,78	RNA
33	94,2	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA	83	85,7	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA
34	142	ng/µl	4,431	2,365	1,87	RNA	84	126	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA
35	250	ng/µl	2,045	1,193	1,71	RNA	85	458	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA
36	34,6	ng/µl	0,326	0,19	1,72	RNA	86	145	ng/µl	3,414	1,777	1,92	RNA
37	154	ng/µl	1,276	0,72	1,77	RNA	87	94,2	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA
38	175,2	ng/µl	0,99	0,524	1,89	RNA	88	175,2	ng/µl	0,99	0,524	1,89	RNA
39	89,2	ng/µl	2,22	1,18	1,88	RNA	89	89,2	ng/µl	2,22	1,18	1,88	RNA
40	90	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA	90	90	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA
41	170	ng/µl	12,31	6,411	1,92	RNA	91	98,2	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA
42	125	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA	92	145	ng/µl	1,763	0,883	2	RNA
43	98,2	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA	93	125,6	ng/µl	0,535	0,303	1,77	RNA
44	90	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA	94	87	ng/µl	0,597	0,343	1,74	RNA
45	165	ng/µl	0,667	0,321	2,08	RNA	95	102	ng/µl	1,615	0,905	1,78	RNA
46	178	ng/µl	3,077	1,607	1,92	RNA	96	148	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA
47	145	ng/µl	1,763	0,883	2	RNA	97	41,7	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA
48	125,6	ng/µl	0,535	0,303	1,77	RNA	98	201	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA
49	56,2	ng/µl	18,08	9,915	1,82	RNA	99	59	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
50	90	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA	100	34,6	ng/µl	0,326	0,19	1,72	RNA

### **RNA 'lardan cDNA Sentezi**

Elde edilen total RNA 'dan "ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs., USA) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. Daha sonra cDNA 'lar PCR tüpü içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elde edilen cDNA 'lar üzerine reaksiyon karışımı bulunan her bir PCR tüpüne 90 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilerek karıştırıldı ve ürünler bir sonraki aşamaya kadar -20 °C 'de saklandı.

### **Real-Time PCR ile HOTTIP Ekspresyon Analizleri**

Çalışmada, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla florasan ışığa yapabilen işaretli (Taqman problu) primerler kullanıldı. Çalışmada, housekeeping olarak ifade edilen kontrol geni olarak beta-aktin kullanıldı ve ortalama ekspresyon değeri belirlenerek, elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri inceleyebilmek için öncelikle Real-Time PCR Light Cycler 480 II cihazının veri tabanından yüklenen örneklerin, ekspresyon değerleri olarak tanımlanan, Row Data ve eşik (CT-Cycle Threshold) değerleri elde edildi. Hastalar, klinik özelliklerine göre gruplara ayrıldı ve Sabioscience sitesinde yer alan PCR Array Veri Analizi sayfasına yüklendi.

Web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT2 profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak, HOTTIP ekspresyon düzeyi endojen housekeeping gen olan beta-actin geni ekspresyon düzeyine oranlandı ve gruplar arasında HOTTIP ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimi (Fold Change) belirlendi. Sabiosciences PCR-Data Analiz sisteminde Student T testi yapılarak HOTTIP 'in gruplar içerisindeki p değeri belirlendi. Sonuçlar % 95' lik güven aralığında ve anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda değerlendirilen 100 hastanın yaş aralığı 26 - 91 arasındaydı ve median yaş 62 olarak belirlendi. Hastaların 78 'i erkek, 22 'si kadın olup 46 hastada primer tümör pankreas başında, 34 'ünde ampulla vateride, 8 'inde duodenumda, 12 'sinde ise distal koledokta lokalizeydi. Tümör çapı en küçük 0,5 cm, en büyük ise 7 cm olup, median çap 2,4 cm 'dir. Tümörlerin %61 'i iyi diferansiye, %29 'u orta diferansiye, %10 'u ise kötü diferansiye özelliği göstermekte idi. CA 19-9 seviyelerine bakılmış olup 0 - 37 arası normal, 37 üstü yüksek olarak belirlenmiştir. CA 19-9 seviyesi operasyon öncesi 29 hastada (%32,3) 37 'nin altında, 61 hastada (%67,7) 37 'nin üstünde ölçülmüş olup 10 hastanın preoperatif CA 19-9 değeri ölçülmemiştir. Operasyon sonrası Ca 19-9 seviyesi 43 hastada (%58,9) 37 'nin altında olup, 30 hastada (%41,1) ise 37 'nin üstündedir. 27 hastanın postoperatif CA 19-9 değeri ölçülmemiştir.

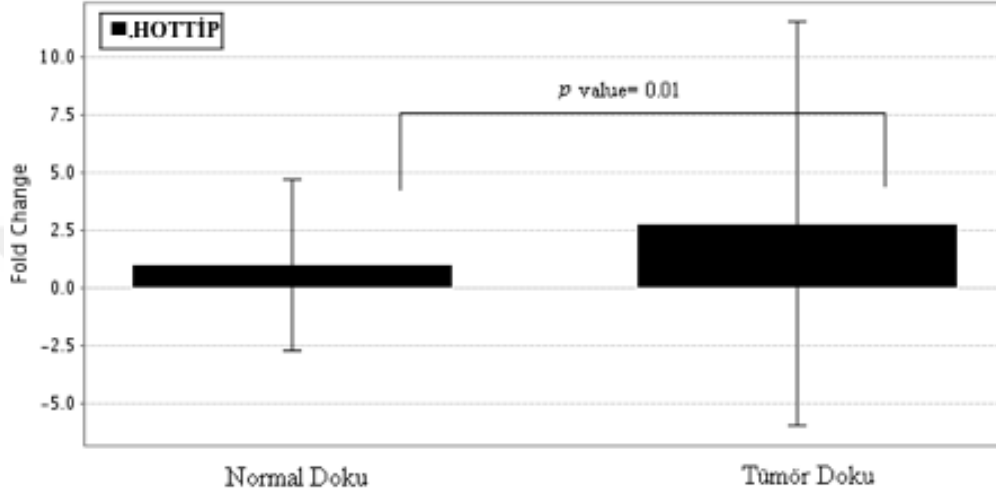
Değerlendirilen 100 hastanın 16 'sının, postoperatif dönemde kendi istekleriyle takipten çıktıkları için, lokal nüks ve uzak metastaz durumu bilinmemektedir. 84 olgu ele alındığında, rezeksiyon sonrası 41 hastada lokal nüks ve 40 hastada uzak metastaz geliştiği gözlemlendi. İlk 12 ay içerisinde 20, 12 aydan sonra ise 21 olguda lokal nüks görülürken, 43 olguda lokal nüks meydana gelmedi. İlk 12 ay içerisinde 27, 12 aydan sonra ise 13 olguda uzak metastaz gelişirken, 44 olguda uzak metastaz görülmedi. 28 olguda ise ne lokal nüks ne de uzak metastaz gelişti.

Whipple prosedürü sonrası 11 hasta ilk 6 ay içerisinde, 17 hasta 7-12 ayları arasında, 32 hasta 13-24 ayları arasında, 27 hasta 24 ay sonrasında öldü, 13 hasta yaşamına devam etmektedir.

İlk olarak tümör dokudaki HOTTIP ekspresyon seviyesi, normal dokudaki ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldı ve tümürlü dokuda 32,8 kat artış gösterdiği gözlemlendi. (p=0,0135) (Tablo-3 ve Şekil-4).

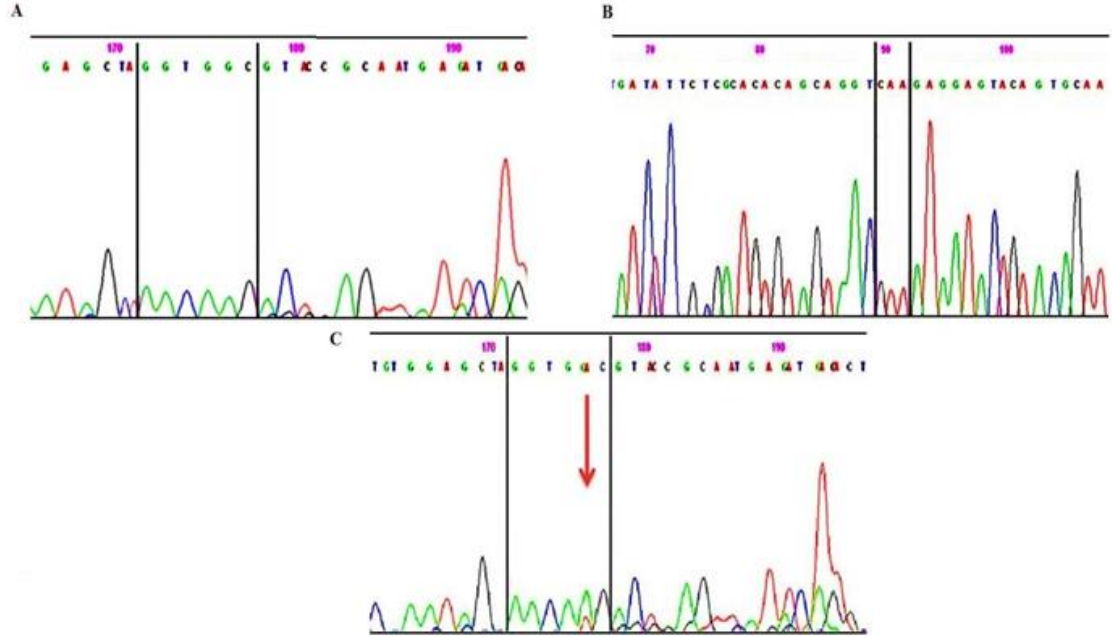
Tablo-3: LncRNA HOTTIP 'in Tümör Dokusundaki Ekspresyon Profili

LncRNA	Normal Doku	Tümör Doku		
	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	$2^{(-Avg.(Delta(Ct))}$	Kat Değişimi	p değeri
<b>HOTTIP</b>	0,689245	2,56956	32,8585	0,0135



Şekil-4: Normal doku ve Tümör dokuda HOTTIP ekspresyon seviyesi. LncRNA HOTTIP, tümöral dokuda 32 kat normal dokuya göre artış göstermektedir. ( $p < 0.05$ ; student T testi; Sabioscience web-based-PCR Array).

Mevcut çalışmada, 100 hastanın 29 'unda kodon 13 mutasyonu saptandı. Diğer çalışmaların (24-27) aksine hastaların hiçbirinde kodon 12 ve kodon 61 mutasyonuna rastlanmadı. (Şekil-5).



Şekil-5: KRAS mutasyon görüntüleri. A. Kodon 12 ve Kodon 13 Normal. B. Kodon 61 Normal C. Kodon 13 Mutasyonlu.

Kodon 13 mutasyon pozitif olan 29 hasta ile KRAS geninde herhangi bir mutasyon taşımayan 71 hastada HOTTIP ekspresyon profili incelendiğinde, Kodon 13 mutasyonu taşımayan 71 hastanın %86 'sında HOTTIP 'in yüksek ekspresyon gösterdiği belirlendi ( $p=0,03$ ). KRAS Kodon 13 mutasyonu bulunan 29 hastada ise HOTTIP ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmedi.

### HOTTIP Ekspresyonu ve Klinik Parametreler

HOTTIP ekspresyonu, pankreas başı tümörlerinde 8,31 kat, papilla vateri tümörlerinde ise 5,23 kat artış gösterdi (Sırası ile  $p=0,0001$ ;  $p=0,003$ ). Duodenum ve distal koledokta lokalize tümörlerde HOTTIP ekspresyonu sırasıyla 2,01 ve 1,45 kat artış gösterdi fakat istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı.

Tümör çapı 2,4 cm den büyük olan tümörlerde HOTTIP 1,8 kat artış gösterdi ( $p=0.126$ ). İyi diferansiasyon gösteren tümörlerde HOTTIP ekspresyonu düşük olup, orta diferansiasyon gösteren tümörlerde 4,34 kat, kötü diferansiasyon gösteren tümörlerde ise 5,67 katlık bir artış belirlendi (Sırası ile;  $p=0,057$ ;  $p=0,051$ ) .

Tümörlerin %54 'ü infiltratif, %32 'si multipaternal, %12 'si polipoid, %2 'si expansive tümör büyüme paterni göstermekte olup dokunun içinde invaziv bir şekilde yayılım gösteren infiltratif büyüme paterninde, normal dokuya oranla HOTTIP ekspresyonunda anlamlı derecede artış saptandı ( $p=0,003$ ). 19 olguda lenfatik invazyon pozitif olarak belirlendi ve bu tümörlerin %82 'sinde HOTTIP ekspresyonu normal dokuya göre 8,01 katlık anlamlı artış gösterdi ( $p=0,001$ ). 45 olguda perinöral invazyon belirlendi ve bu tümörlerde HOTTIP ekspresyonu normal dokuya oranla 4,67 kat artış gösterdi ( $p=0,052$ ). Preoperatif dönemde CA 19-9 değeri 37 'den büyük olan olgularda HOTTIP yüksek ekspresyon gösterdi ( $p=0,0505$ ). Rezeksiyon sonrası 84 hastanın 27 'sinde ilk 12 ay içerisinde uzak organ metastazı gelişti ve bu olguların tümör dokularında HOTTIP ekspresyonu 3,47 kat artış gösterdi ( $p=0,0506$ ). Preoperatif ve postoperatif CA 19-9 değerleri, lokal nüks, uzak organ metastazı durumuna göre HOTTIP ekspresyon düzeyi ve referans proteine göre değerlendirilmesi Tablo 4 de gösterilmektedir (Tablo 4).



Tablo 4. Hastalara ait klinikopatolojik özellikler ve HOTTIP ekspresyonları

	n (%)	KatDeğişimi	P value
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın	22 (%22)	1,21	0,743
Erkek	78 (%78)	0,84	0,643
<b>Tumor Lokalisasyonu</b>			
Duodenum	8 (%8)	2,01	0,067
Distal Koledok	12 (%12)	1,45	0,736
Pankreas başı	46 (%46)	8,31	0,0001
Papilla vateri	34 (%34)	5,23	0,003
<b>Tümör Büyüme Paterni</b>			
Infiltrative	54 (%54)	5,09	0,003
Expansive	2 (%2)	1,62	0,212
Polypoid	12 (%12)	3,24	0,131
Multipattern	32 (%32)	1,23	0,298
<b>Grade</b>			
Grade 1-2	90 (%90)	3,5	0,076
Grade 3	10 (%10)	4,59	0,0534
<b>Lenfatik İnvazyon</b>			
(+)	19 (%19)	8,01	0,001
(-)	81 (%81)	1,03	0,937
<b>Perinöral İnvazyon</b>			
(+)	45 (%45)	4,67	0,052
(-)	55 (%55)	0,98	0,834
<b>Venöz İnvazyon</b>			
(+)	8 (%8)	1,56	0,635
(-)	92 (%92)	0,13	0,625
<b>Ülserasyon</b>			
(+)	43 (%43)	1,34	0,625
(-)	57 (%57)	0,98	0,762
<b>Nekroz</b>			
(+)	31 (%31)	2,12	0,625
(-)	69 (%69)	0,09	0,525
<b>Differensasyon</b>			
İyi	61 (%61)	0,87	0,125
Orta	29 (%29)	4,34	0,057
Kötü	10 (%10)	5,67	0,051
<b>Pre-op Ca 19-9 (n= 90)</b>			
< 37	29 (%32,3)	1,34	0,364
>37	61 (%67,7)	5,67	0,0505
<b>Post-op Ca 19-9 (n= 73 )</b>			
< 37	43 (%58,91)	0,09	0,635
>37	30(%41,09)	1,98	0,365

Lokal Nüks (n= 84)			
< 12 ay	20 (%23,8)	2,45	0,063
> 12 ay	21 (%25)	2,04	0,096
(-)	43 (%51,2)	1,07	0,245
Uzak Metastaz (n= 84)			
< 12 ay	27 (32,1)	3,47	0,0506
> 12 ay	13 (15,5)	2,38	0,073
(-)	44 (%52,4)	1,37	0,364
Sağ Kalım			
Yaşayan	13 (%13)	1,3	0,256
0-6 ay	11 (%11)	8,75	0,0012
7-12 ay	17 (%17)	5,6	0,0512
13-24 ay	32 (%32)	1,78	0,294
>24 ay	27 (%27)	1,46	0,165

Postoperatif ilk 6 ay içerisinde ölen 11 hastada HOTTIP ekspresyonu 8,7 kat artış gösterdi ( $p=0,0012$ ). Değerlendirilen olguların %30 'u hastalıksız sağ kalıma, sahipti. HOTTIP ekspresyonu hastalıksız sağ kalıma sahip 30 olguda 1,89 kat artış gösterdi. ( $p=0,645$ ). Cinsiyet, yaş ve grade ile HOTTIP ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki gözlenmedi.

Sonuç olarak HOTTIP ekspresyonu; pankreas başı ve ampulla vateri bölgesinde lokalize, infiltratif büyüme paterni gösteren, lenfatik invazyon yapmış, preoperatif dönemde yüksek CA 19-9 düzeyine sahip, 1 yıldan önce uzak metastaz yapmış ve 6 aydan daha kısa süre yaşayan hastalarda yüksek bulunmuştur.

## TARTIŞMA

Genetik alışmalar sonucunda, periampuller bölge tümörlerinin oluşumunda, *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* ve *SMAD4/DPC4* genlerinde meydana gelen değişimlerin rol oynadığı belirlenmiştir (48,49). Tanımlanan bu genlerin etkili oldukları sinyal yolakları belirlenmiş fakat oluşum mekanizmaları tam olarak çözülememiştir.

Son dönemde ENCODE projesi ile RNA interferans adında yeni bir mekanizma tanımlanmıştır (29). Bu mekanizma kanser oluşumunda protein kodlayan genler kadar protein kodlamayan fakat bir çok hücresele fonksiyonda görev alan genlerin de etkili olduklarını ve bunlardan transkribe edilen RNA 'ların onkogen ya da tümör baskılayıcı gen özellikleri göstererek tümör oluşumunu başlattıkları, ayrıca, tümöre kötü prognoz kazandırdıkları gözlenmiştir (30). Bu moleküllerin ilaç direnç mekanizmaları ile de ilişkili olabilecekleri vurgulanmıştır ve bu konudaki çalışmalar devam etmektedir.

İlk yapılan ENCODE alışmalar ile önce miRNA 'lar tanımlanmıştır (29). Ardından son beş yılda, geliştirilen teknolojiler ile LncRNA 'lar bulunmuştur. Ayrıca LncRNA 'ların popülasyonlar arası farklılık gösterdikleri belirlenmiş ve popülasyon bazlı çalışmalar başlatılmıştır (50). Mevcut alışmamızda sporadik kökenli, rezektable periampuller bölge tümörüne sahip yandaş hastalığı olmayan ve sonuçta whipple prosedürü uygulanmış hastalarda HOTTIP ekspresyonu; tümöral dokuda, normal doku ile karşılaştırıldığında, 32 kat arttığı belirlendi. Ayrıca yaş ve cinsiyetler ile HOTTIP ekspresyonu arasında bir ilişki kurulamadı. Elde ettiğimiz bu sonuç Wang ve arkadaşlarının çalışmasıyla örtüşmektedir. (45)

Cheng ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışma ile HOTTIP ekspresyonunun pankreas tümör dokularında anlamlı derecede arttığını ifade ettiler (46). Çalışmamızda tüm periampuller bölge kanserleri değerlendirilmiş olup HOTTIP 'in ekspresyon artışı özellikle pankreas başı olmak üzere ek olarak ampulla vateri tümörlerinde de belirgin yüksek bulundu. Kötü

prognozla ilişkilendirilen HOTTIP ekspresyon artışı bu bölge tümörlerinin daha agresif seyirli olmalarına neden olmaktadır (45)

Literatürde pankreas kanserlerinin yaklaşık % 90 'ının *KRAS* kodon 12 mutasyonu taşıdığı ifade edilmektedir (51). Mevcut çalışmamızda, vakaların 29 'unda *KRAS* kodon 13 mutasyonu belirlendi. Hiç bir vakada *KRAS* kodon 12 ve 61 mutasyonu gözlenmedi. Bunun nedeni olarak popülasyonlar arası *KRAS* mutasyonunun, farklılık gösterdiği akla gelmektedir (52-54). Bununla birlikte, mutasyon taşımayan vakaların %86 'sında HOTTIP ekspresyonu yüksek bulundu. Diğer bir deyişle çalışmamıza dahil edilen kötü prognoza sahip hastaların çoğunda *KRAS* mutasyonu saptanmadı. Literatürde *KRAS* mutasyon durumu bilinen pankreas kanseri hastalarında yapılmış herhangi bir HOTTIP ekspresyon çalışması yoktur.

Çalışmamızda, infiltratif büyüme patternine sahip hastalarda HOTTIP 'in 5,09 kat anlamlı şekilde arttığı belirlendi. Literatürde infiltratif büyüme paterni, kolon ve rektum kanserlerinde kısa sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (55). Periapuller bölge tümörlerinde yapılan patoloji çalışmalarında ise infiltratif büyüme patterni ile tümör tomurcuklanması arasında bir ilişki belirlenmiş ve bu büyüme paterninin kötü prognoz ile bağlantılı olabileceği savunulmuştur (56). Çalışmamızda normal dokuya göre; Grade 3 tümörlerde HOTTIP ekspresyonunda 4,59 katlık artış saptanarak anlamlılığa yakın sonuç elde edildi. Ancak grade 1 ve 2 tümörlerde anlamlılık saptanmadı. Literatürde grade ile kötü prognoz arasında bir bağlantı kurulamamıştır. (57) Ancak HOTTIP ve grade arasında bir ilişkiyi açıklamaya çalışan çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda değerlendirilen hastaların %19 'unda lenfatik invazyon mevcuttu. Bu olgularda HOTTIP ekspresyonu 8,01 kat, lenfatik invazyon olmayan tümöral dokulara göre anlamlı artış gösterdi. Lenfatik invazyon periapuller bölge tümörleri için kötü prognostik bir parametredir. Yapılan çalışmalar ile LncRNA 'ların lenfatik invazyon ile ilişkili oldukları saptanmıştır. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pankreas kanserlerinde, lenfatik invazyon ve HOTTIP ekspresyon artışı arasında anlamlı bir ilişki saptadılar (45,57-59). Ancak bizim çalışmamız dışında; periapuller bölge

tümörlerinde, lenfatik invazyon ve HOTTIP ekspresyon artışı arasındaki anlamlı ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir araştırma literatürde görülmemektedir. Çalışmamızda hastaların % 45 'inde perinöral invazyon varlığı tespit edildi ve HOTTIP ekspresyonu bu vakalarda 4,67 kat arttı ve istatistiksel olarak anlamlılığa yakın sonuç elde edildi. Olgu sayısı artırılarak yapılacak çalışmalar ile, bu kat artışının anlamlı seviyeye ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Bunlara karşılık venöz invazyon pozitif olan hastalarda HOTTIP ekspresyon artışında anlamlılık saptanmadı. Yine ülserasyon ve nekroz gösteren tümöral dokularda, normal pankreas dokusuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılığa rastlanmadı. Tümöral dokuların patolojik diferansiyasyon özelliği incelendiğinde ise orta ve kötü diferansiye tümörlerde HOTTIP ekspresyon artışı anlamlılığa yakın bulunmuştur. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada pankreas kanseri dokularında patolojik diferansiyasyon derecesi ile HOTTIP ekspresyon artışı arasında anlamlı ilişki saptadılar (45). Çalışmamızda elde ettiğimiz; patolojik verilerin, HOTTIP ekspresyonu ile olan ilişkisi, önceki çalışmalarını desteklemektedir.

Preoperatif dönemde yapılan klinik testler içerisinde CA 19-9 seviyesi tümör belirteci olarak kullanılmaktadır. Bu parametre postoperatif dönemde düşüş gösterirse bu durum tedaviye yanıtın iyi olduğu anlamına gelmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada preoperatif dönemde CA 19-9 seviyesi 37 'nin üzerinde olan 61 hasta, postoperatif dönemde 30 hastaya geriledi. HOTTIP ekspresyonu; preoperatif dönemde, CA 19-9 seviyesi 37 'nin üzerinde olan olgularda 5,67 kat arttı ve istatistiksel olarak anlamlılığa çok yakın bulundu. Literatürde Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, pankreas kanserli hastalarda, CA 19-9 seviyesi ile HOTTIP arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (45). Bununla birlikte bu konudaki bir ilişkidenden bahsedebilmek için; her iki parametrenin aynı dokudan bakılması (HOTTIP ekspresyonu tümöral dokuda, CA 19-9 seviyesi ise kanda bakıldığından) ve HOTTIP 'in ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası kandaki değerlerinin tam olarak bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle CA 19-9 ve HOTTIP arasındaki

ilişkiyi ifade etmek için çalışmamız yetersiz olup, ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

İlk 12 ay içerisinde lokal nüks gösteren olgularda, HOTTIP ekspresyonu 2,45, uzak metastaz gösteren olgularda ise 3,47 kat arttı ve istatistiksel olarak anlamlılığa çok yakın değerler elde edildi. Wang ve arkadaşları pankreas kanseri ile erken rekürrens arasında anlamlı ilişki olduğunu gösterdiler. (45) Çalışmamızda yine olgu sayısının artması ile anlamlılığa ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Literatürde yer alan, özellikle hücre hatları ile yapılan çalışmalarda HOTTIP, hücre invazyonu ve migrasyonu ile ilişkili bulunduğu gözlemlendi (46). Mevcut çalışmamızda elde ettiğimiz veriler hücre hatları ile yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Cheng ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada; yüksek HOTTIP ekspresyonunun kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu belirtildi (46). Çalışmamızda özellikle ilk 6 ay içerisinde ölen vakalarda HOTTIP ekspresyonu 8,75 kat artarak istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Mevcut çalışmamızda, literatürde yer alan pankreas kanseri araştırmalarından farklı olarak tüm periampuller bölge tümörleri değerlendirildiğinde *KRAS* mutasyonu taşımayan olgularda, HOTTIP ekspresyonunun tümör oluşumunda etkili bir mekanizma olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yüksek HOTTIP ekspresyonu, diğer periampuller bölge tümörlerine göre pankreas başı ve ampulla vateri lokalizasyonlu tümörlerde daha yüksek gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, kısa sağ kalım, infiltratif büyüme paterni ve/veya lenfatik invazyon varlığı gibi kötü prognoz parametrelere sahip hastalarda HOTTIP 'in yüksek ekspresyonu anlamlı olarak belirlenmiştir.

Periampuller bölge tümörleri, tedaviye direnç gösteren son derece agresif ve kötü prognoza sahip tümörlerdir. Erken tanısal parametreler olmadığı gibi kötü prognozu tanımlayacak belirteçlerde oldukça yetersizdir. Rezeksiyon sonrası adjuvan tedavilerin etkinliği de sınırlıdır. HOTTIP ekspresyonu yüksek olan hastalarda, ileride geliştirilebilecek HOTTIP 'i

susturmaya yönelik ilaç ve gen araştırmalarının yapılması, bu kanserlerin tedavi şansını da arttıracaktır.

Kanser taramalarında uygun biyomarker 'ların tespit edilmesi esas amaçtır. Literatürde ve bizim çalışmamızda yer alan HOTTIP düzeyinin anlamlı artış gösterdiği parametreler; HOTTIP 'in bir biyomarker olabileceğini göstermektedir. Ancak ideal bir biyomarker 'ın yüksek özgülük, yeterli duyarlılık, erken tanı koydurucu ve minimal invaziv özelliklere sahip olması gereklidir. Yapılan çalışmaların hepsinde HOTTIP ekspresyonu; rezeksiyon materyallerinde yada biyopsi ile alınan ve uygun ortamlarda geliştirilen hücre hatlarında bakılmıştır. Oysa ki ileride yapılacak çalışmalarda HOTTIP 'in kanda yada vücut sıvılarında sirküle olmasının yada yıkım ürünlerinin / fragmanlarının tespit edilmesi; pankreas kanseri taramasında, cerrahi kararının alınmasında yada adjuvan tedavilerin protokollerinin belirlenmesinde çığır açması kaçınılmaz olacaktır.

Sonuç olarak, Türk populasyonunda sporadik olarak gelişen periampuller bölge tümörlerine sahip hastalarda kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir. Çalışmada elde edilen bulguların bundan sonraki ileri fonksiyonel araştırmalar için yol gösterici olması düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855#> (E.T: 16/09/2016)
2. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(3):266-272.
3. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006; 1(2):76-80.
4. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones AP. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429:457-63.
5. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309:1559-63.
6. Mattick JS. A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol* 2007; 210:1526-47. doi:10.1242/jeb.005017
7. Kapranov P. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 2007; 316: 1484-8. doi:10.1126/science.1138341
8. Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 2000; 19:5194-201. doi:10.1093/emboj/19.19.5194
9. Uomo G. Periampullary carcinoma: some important news in histopathology. *JOP* 2014;15:213-5.
10. Berberat PO, Kunzli BM, Gubinas A, et al. An audit of outcomes of a series of periampullary carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2009;35:187-91.
11. Beger HG, Treitschke F, Gansauge F, et al. Tumor of the ampulla of Vater: Experience with local or radical resection in 171 consecutively treated patients. *Arch Surg* 1999;134:526-32.
12. C.J. Yeo, J.L. Cameron, T.A. Sohn, *et al.* Six hundred fifty consecutive pancreatoduodenectomies in the 1990s; pathology, complications, and outcomes *Ann Surg*, 226 (1997), pp. 248-257
13. Abelloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, *Carcinoma of the Pancreas*. Clinical Oncology. 4 th. ed. Philadelphia PA: Churchill Livingstone-Elsevier, 2008.p. 1596
14. Seigel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2012; 62:10-29.
15. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>: SEER Stat Fact Sheets. [Accessed March 20, 2009.] (E.T: 16/09/2016)
16. Ozkan H, Ozturk H. Pankreas kanserinde epidemiyoloji ve risk faktorleri. *MNKlinik Bilimler&Doktor* 2000;6(1):39-43
17. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, et al. Pancreaticoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, *Ann Surg* 2002; 236: 355-366.
18. Amundadottir LT, Pancreatic Cancer Genetics. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 28;12(3):314-25. doi: 10.7150/ijbs.15001. eCollection 2016.



19. Roder JD, Schneider PM, Stein HJ, Siewert JR. Number of Lymph Node Metastases is Significantly Associated with Survival in Patients with Radically Resected Carcinoma of The Ampulla of Vater. *Br J Surg* 1995;82 (12):1693-6.
20. Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, et al. Natural history of ampullary adenoma in familial adenomatous polyposis: reconfirmation of benign nature during extended surveillance. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1557–1562.
21. Morris-Stiff G, Alabraba E, Tan YM, et al. Assessment of Survival Advantage in Ampullary Carcinoma in Relation to Tumour Biology and Morphology. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35(7):746-50.
22. Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, et al. Periampullary Adenocarcinoma: Analysis of 5-Year Survivors. *Ann Surg* 1998; 227(6):821-31.
23. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2016 Jul 2;388(10039):73-85. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0. Epub 2016 Jan 30.
24. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2002 Dec;2(12):897-909.
25. Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, et al. Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci* 2013, Sep 30;14(10):19731-62.
26. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2006 May 15;20(10):1218-49.
27. Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC, Der CJ (2014) *KRAS*: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci* 39(2): 91–100.
28. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Iacobuzio-Donahue CA. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010; 467:1114–1117
29. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007; 447:799–816.
30. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409:860–921.
31. St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in genetics* : 2015; 31:239–251
32. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews Genetics.* 2009; 10:155–159
33. Kunjinty PR, Bojmar L, Tjomsland V, et al. MicroRNA-199a and -214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor. *Oncotarget.* 2016 Mar 29;7(13):16396-408. doi: 10.18632/oncotarget.7651.
34. Bimonte S, Barbieri A, Leongito M, et al. The Role of miRNAs in the Regulation of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:8352684. doi: 10.1155/2016/8352684. Epub 2016 Feb 24.
35. Peng JF, Zhuang YY, Huang FT, Zhang SN. Noncoding RNAs and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 14;22(2):801-14. doi: 10.3748/wjg.v22.i2.801.

36. Qi P1, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Mod Pathol.* 2013 Feb;26(2):155-65. doi: 10.1038/modpathol.2012.160. Epub 2012 Sep 21
37. Chen W, Bocker W, Brosius J, et al. Expression of neural BC200 RNA in human tumours. *J Pathol* 1997; 183:345–351
38. Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010;464:1071–6
39. J.H. Yoon, J. Kim, M. Gorospe, Long noncoding RNA turnover. *Biochimie* 1859, 209 –221 (2015)
40. Li Z, Yu X, Shen J. ANRIL: A pivotal tumor suppressor long non-coding RNA in human cancers. *Tumour Biol.* 2016 May;37(5):5657-61. doi: 10.1007/s13277-016-4808-5. Epub 2016 Jan 11
41. Weakley SM, Wang H, Yao Q, Chen C. Expression and function of a large non-coding RNA gene XIST in human cancer. *World J Surg* 2011;35:1751–6
42. Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One* 2007;2:e845.
43. Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003;22:8031–41.
44. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, et al. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 2010;465:1033–8
45. Wang Y, Li Z, Zheng S, et al. Expression profile of long non-coding RNAs in pancreatic cancer and their clinical significance as biomarkers. *Oncotarget.* 2015 Nov 3;6(34):35684-98. doi: 10.18632/oncotarget.5533
46. Cheng Y, Jutooru I, Chadalapaka G, Corton JC, Safe S. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):10840-52
47. Egili U, Ak S, Cecener G, et al. Impact of 3'UTR variation patterns of the KRAS gene on the aggressiveness of pancreatobiliary tumors with the KRAS G13D mutation in a Turkish population. *Pancreatology.* 2016 Jul-Aug;16(4):677-86. doi: 10.1016/j.pan.2016.05.004.
48. Nigel B. Jamieson, David K. Chang, Andrew V. Biankin, Cancer Genetics and Implications for Clinical Management. *Surg Clin N Am* 95 (2015) 919–934
49. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487(7407):330–7
50. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell.* 2016 Apr 11;29(4):452-63. doi: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
51. Buscail L, Bournet B, Dufresne M, Torrisani J, Cordelier P. Advance in the biology of pancreatic of cancer. *Bull Cancer.* 2015 Jun;102(6 Suppl 1):S53-61. doi: 10.1016/S0007-4551(15)31218-2.
52. Scarpa A, Capelli P, Villaneuva A, et. al. Pancreatic cancer in Europe: Kras gene mutation pattern shows geographical differences. *Int J Cancer* 1994;15:167e71.

53. Kohler I, Jacob D, Budzies J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carcinomas of the papilla of Vater has prognostic and putative therapeutic implications. *Am J Clin Pathol* 2011;135: 202e11.
54. Wei S, Liang Z, Gao J, et al. Patterns of Kras codon 12 and 13 mutations found in pancreatic adenocarcinoma of 30 Chinese patients by microdissection, PCR and direct sequencing. *J. Gastroenterol Hepatol* 2005;20: 67e72.
55. Morikawa T, Kuchiba A, Qian ZR, et al. Prognostic significance and molecular associations of tumor growth pattern in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jun;19(6):1944-53.
56. Nobuyuki Ohike, Ipek Coban, MD, Grace E. Kim et al. Tumor Budding as a Strong Prognostic Indicator in Invasive Ampullary Adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010 Oct; 34(10): 1417–1424.
57. Sunil BJ, Seshadri RA, Gouthaman S, Ranganathan R. Long-Term Outcomes and Prognostic Factors in Periapillary Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2016 Aug 3. [Epub ahead of print]
58. John W C Chen, Mayank Bhandari, David S Astill et al. Predicting patient survival after pancreaticoduodenectomy for malignancy: histopathological criteria based on perineural infiltration and lymphovascular invasion. *HPB (Oxford)*. 2010 Mar; 12(2): 101–108.
59. Huang Q, Liu L, Liu CH et al. MicroRNA-21 regulates the invasion and metastasis in cholangiocarcinoma and may be a potential biomarker for cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):829-34.

## TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı 'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıları ve tez çalışmam sırasında anlayış, sabır, özveri ve bilimsel desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ekrem KAYA hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, azim, deneyim, meslek sevgisi ile bana örnek olan ve eğitimime büyük emeği geçen Genel Cerrahi A.D. öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. İsmet TAŞDELEN, Sn. Prof. Dr. Halil BİLGEL, Sn. Prof. Dr. Nusret KORUN, Sn. Prof. Dr. Yılmaz ÖZEN, Sn. Prof. Dr. Tuncay YILMAZLAR, Sn. Prof. Dr. Sadık KILIÇTURGAY, Sn. Prof. Dr. Şehsuvar GÖKGÖZ, Sn. Doç. Dr. Türkay KIRDAK, Sn. Doç. Dr. Ersin ÖZTÜRK, Sn. Yard. Doç. Dr. Pınar SARKUT, Sn. Uzm. Dr. Halit Ziya DÜNDAR, Sn. Uzm. Dr. Özgen IŞIK hocalarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tezimin her aşamasında bana bilimsel katkı ve destek sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi, arkadaşım Dr. Seçil AKSOY 'a teşekkür ederim.

İhtisas sürem boyunca güzel bir uyum içinde birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Genel Cerrahi A.D hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tanıdığım günden beri hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez aşamasında da bana her türlü manevi desteği veren ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Rabia Nur Balçın 'a, ayrıca evlatları olmaktan onur ve gurur duyduğum, hiçbir karşılık beklemeden maddi ve manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim aileme ayrı ayrı sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Özkan BALÇIN  
BURSA, 2016

## ÖZGEÇMİŞ

12 Nisan 1982 yılında Trabzonda doğdum. İlk öğrenimimi, Araklı Yolgören Yeşilova İlkokulu 'nda, orta ve lise öğrenimimi Trabzon Yunus Emre Anadolu Lisesi 'nde tamamladım. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi 'ne başladım ve 2007 yılında mezun oldum. 2008 yılında Erzurum Köprüköy İlçe Hastanesinde pratisyen hekim olarak zorunlu hizmetime başladım. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.D da uzmanlık eğitimime başladım.

